

STRESS REACTION RELAXING AGENT FOR ANIMAL AND STRESS REACTION RELAXATION**Publication number:** JP10175866 (A)**Publication date:** 1998-06-30**Inventor(s):** ITO SHINOBU; OGATA EIJI; YAMADA MASAHIRO +**Applicant(s):** SHOWA DENKO KK +**Classification:**

- **International:** A23K1/16; A61K31/025; A61K31/047; A61K31/35; A61K31/355; A61K31/375; A61K31/52; A61K31/665; A61K31/70; A61P25/20; A81P43/00; A23K1/16; A61K31/02; A61K31/045; A61K31/35; A61K31/352; A61K31/375; A61K31/519; A61K31/665; A61K31/70; A61P25/00; A61P43/00; (IPC1-7): A23K1/16; A61K31/025; A61K31/35; A61K31/355; A61K31/375; A61K31/52; A61K31/665; A61K31/70

- **European:** A61K31/70

Application number: JP19960354314 19961218**Priority number(s):** JP19960354314 19961218**Also published as:** EP0848955 (A1) EP0848955 (B1) DE69723659 (T2) AT245423 (T)**Abstract of JP 10175866 (A)**

PROBLEM TO BE SOLVED: To develop a stress reaction relaxing agent for animals for reducing the growth inhibition and death rate of animals and to provide a stress reaction relaxing way by using a feed composition blended with the stress reaction relaxing agent. **SOLUTION:** This stress reaction relaxing agent for animals contains as active ingredient, at least one kind of compound selected from L-ascorbic acid-2 phosphoric acid, its salts and L-ascorbic acid-2-glucoside each of which restrains the increase of plasma lactate dehydrogenase(LDH), malate dehydrogenase(MDH), aspartate aminotransferase (AspAT) and blood stress protein which are contained in the blood and increase while animals are in a stressed condition. The other objective stress reaction relaxing way for animals is to administer them with this agent at ≥ 0.03 g/kg of individual animal body weight.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

(51)Int.Cl. ^a	識別記号	F I
A 6 1 K 31/665		A 6 1 K 31/665
A 2 3 K 1/16	3 0 2	A 2 3 K 1/16
	3 0 3	3 0 2 B
A 6 1 K 31/025	ADS	A 6 1 K 31/025
31/35		ADS
		31/35

審査請求 未請求 請求項の数11 F D (全 11 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平8-354314	(71)出願人 000002004 昭和電工株式会社 東京都港区芝大門1丁目13番9号
(22)出願日	平成8年(1996)12月18日	(72)発明者 伊東 忍 東京都港区芝大門一丁目13番9号 昭和電工株式会社内
		(72)発明者 小方 英二 東京都港区芝大門一丁目13番9号 昭和電工株式会社内
		(72)発明者 山田 眞裕 茨城県つくば市観音台1-2-7
		(74)代理人 弁理士 菊地 精一

(54)【発明の名称】 動物用ストレス反応緩和剤及びストレス反応の緩和方法

(57)【要約】

【課題】 動物の成育阻害や死亡率の低下させるための、動物用ストレス反応緩和剤の開発及び該ストレス反応緩和剤を配合した飼料組成物用いてストレス反応を緩和する方法の提供

【解決手段】 動物のストレス時に増加する血液中の血漿Lactate dehydrogenase(乳酸デヒドロゲナーゼ)(LDH)、Malate dehydrogenase(リンゴ酸デヒドロゲナーゼ)(MDH)、Aspartate aminotransferase(アスパラギン酸アミノ基転移酵素)(AspAT)及び血中ストレスプロテイン(ストレスタンパク質)の上昇を抑制するL-アスコルビン酸-2-リノ酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシドから選択される一種以上を有効成分として含有する動物用ストレス反応緩和剤、飼料組成物及びそれらを用いた動物のストレス反応緩和方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 動物のストレス時に増加する血液中の血漿Lactatedehydrogenase(乳酸デヒドロゲナーゼ)(LDH)、Malatedehydrogenase(リンゴ酸デヒドロゲナーゼ)(MDH)、Aspartateaminotransferase(アスパラギン酸アミノ基転移酵素)(AspAT)及び血中ストレスプロテイン(ストレスタンパク質)の上昇を抑制するL-アスコルビン酸-2-リノ酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシドから選択される一種以上を有効成分として含有することを特徴とする動物用ストレス反応緩和剤。

【請求項2】 L-アスコルビン酸-2-リノ酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシドから選択される一種以上に抗酸化物質を配合した請求項1記載の動物用ストレス反応緩和剤。

【請求項3】 抗酸化物質が、カロチン、アスタキサンチン、ルテイン、d1- α -トコフェロール酢酸エステル、 α -トコフェロール、SOD、グルタチオン及びカテキン類の少なくとも一種である請求項2記載の動物用ストレス反応緩和剤。

【請求項4】 請求項1～3のいずれかに記載の動物用ストレス反応緩和剤を、プレミックス、動物用薬剤または栄養強化剤として飼料組成物に配合した動物用ストレス反応緩和剤組成物。

【請求項5】 動物のストレス時に増加する血液中の血漿Lactatedehydrogenase(乳酸デヒドロゲナーゼ)(LDH)、Malatedehydrogenase(リンゴ酸デヒドロゲナーゼ)(MDH)、Aspartateaminotransferase(アスパラギン酸アミノ基転移酵素)(AspAT)及び血中ストレスプロテイン(ストレスタンパク質)の上昇を抑制するため、L-アスコルビン酸-2-リノ酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシドから選択される一種以上の物質を、0.03g/kg体重以上を投与することを特徴とする動物のストレス反応を緩和する方法。

【請求項6】 動物のストレス時に増加する血液中の血漿Lactatedehydrogenase(乳酸デヒドロゲナーゼ)(LDH)、Malatedehydrogenase(リンゴ酸デヒドロゲナーゼ)(MDH)、Aspartateaminotransferase(アスパラギン酸アミノ基転移酵素)(AspAT)及び血中ストレスプロテイン(ストレスタンパク質)の上昇を抑制するため、有効成分としてL-アスコルビン酸-2-リノ酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシド及びその塩類から選択される一種以上の物質を、0.03g/kg体重以上と他の抗酸化物質を0.02g/kg体重以上を同時に投与することを特徴とする動物のストレス反応を緩和する方

法。

【請求項7】 動物が、牛、豚、犬、猫、ニジマス、鮎、鯉、鯛、鮭、鰻、ハマチ、フグ、ヒラメ、マグロ、アジ、車エビである、請求項5または6のいずれかに記載の動物用ストレス反応を緩和する方法。

【請求項8】 動物の飼料に対し、有効成分としてL-アスコルビン酸-2-リノ酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシドから選択される一種以上を含有する動物用ストレス反応緩和剤を、有効成分300ppm以上配合した飼料組成物。

【請求項9】 動物の飼料に対し、有効成分としてL-アスコルビン酸-2-リノ酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシドから選択される一種以上の物質を300ppm以上と、抗酸化物質200ppm以上を含有する動物用ストレス反応緩和剤を配合した飼料組成物。

【請求項10】 請求項8または9のいずれかに記載の、有効成分としてL-アスコルビン酸-2-リノ酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシドから選択される一種以上の物質を300ppm以上、またはこれと抗酸化物質を200ppm以上を含有する動物用ストレス反応緩和剤を配合した飼料組成物を、牛、豚、犬、猫、ニジマス、鮎、鯉、鯛、鮭、鰻、ハマチ、フグ、ヒラメ、マグロ、アジまたは車エビに給飼する動物のストレス反応を緩和する方法。

【請求項11】 有効成分としてL-アスコルビン酸-2-リノ酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシドから選択される一種以上の物質を300ppm以上、またはこれと抗酸化物質を200ppm以上を含有する動物用ストレス反応緩和剤を配合した飼料組成物が、エクストルーダー、エキスパンダー、ペレットマシンまたは乾燥機で80°C以上に加熱された飼料組成物である請求項8または9のいずれかに記載の飼料組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、動物に対するストレス反応緩和剤及びストレス反応緩和方法に関する。詳しくは、動物のストレス時の、血液中の血漿酵素であるLDH、MDH、AspATの上昇反応及びストレスプロテインの上昇反応を抑制することにより、動物のストレス反応を緩和するためのストレス反応緩和剤及び該緩和剤を動物に投与することによりストレス反応を緩和する方法に関する。本発明の動物用ストレス反応緩和剤は、動物に対するストレス反応が予防でき、ストレスに伴う体重減少、免疫力低下等の各種弊害を防止できる。

【0002】

【従来の技術】 L-アスコルビン酸は栄養学上重要な栄養素の1つであり、多くの生物飼料にその単体またはその塩類や誘導体が添加されている。特に近年、牛、豚などの家畜、ニジマス、鮎、鯉、鯛、鮭、鰻、ハマチ、フ

グ、ヒラメ、マグロあるいはアジ等の有用水産動物においては高密度飼育、高密度養殖がなされており、また犬、猫などにおいても放し飼いの禁止や騒音などによりストレスを受けることが避けられない。このような飼育環境下においては通常の温度状態等でもこれら動物はストレスをうけていることになる。従って、通常の飼育条件に比べアスコルビン酸の要求性が高いとされており、摂取するアスコルビン酸が欠乏すると体重の減少、免疫力の低下、弊死率の増加等の現象が発生し、養殖業者などに多大な経済的損失が発生していた。特に夏場の高温環境、冬場の低温環境下では、これらのストレスは一層増幅され、経済的損失も増加していた。

【0003】ストレスを減少させるため、多種類の動物用飼料にアスコルビン酸は添加されてきたが、一般的のL-アスコルビン酸は酸化分解されやすく、飼料等に添加しても速やかに失活し、その効果を持続させることが困難であるという問題があった。特に最近飼料の製造において、一般的に使用されているペレットミル、エクストルーダーなどの加熱型造粒機は原料温度を高温にするため、一般的のL-アスコルビン酸では速やかに分解されてしまうこと、また一般的のL-アスコルビン酸は吸収性も悪く、飼料等に添加しても充分な効果を発揮できないという問題もあった。

【0004】これらの問題を解決するため最も一般的な技術として、安価なアスコルビン酸類の細粒をコーティングして飼料に配合する提案がなされている。例えば特開昭52-15812号、特開昭53-127819号、特開昭54-109962号、特開昭54-154514号、特開昭55-4913号、特開昭57-59803号、特開昭57-85317号、特開昭58-205461号、特開昭59-44327号、特開昭63-164864号、特開昭63-258813号、特開昭64-3118号、特開昭64-3119号、特開平1-500113号、特開平1-296953号、特開平2-46259号等がある。これらのコーティング技術に共通する点は、コーティングしたアスコルビン酸類の粒子が、飼料などの製造工程中の粉碎工程でコーティング粒子が破壊されないように、その粒径を1mm以下の微粒子として造粒している点である。このため表面積は大となり、空気中の酸素が浸透しやすく、飼料の高温加圧成型機による飼料の製造工程及び流通過程においてコーティングされたL-アスコルビン酸が容易に酸化分解されてしまう問題があった。

【0005】このため、酸化されにくいL-アスコルビン酸-2-硫酸エステル等のL-アスコルビン酸の安定化誘導体を飼料に添加する方法が提案されている。例えば特開昭49-24783号はアスコルビン酸-2-ベンゾエート、アスコルビン酸-2, 6-ジパルミテート、アスコルビン酸-3-パルミテート、アスコルビン酸-3-ステアレート、アスコルビン酸-3, 6-ジス

テアレートあるいはアスコルビン酸-2-ホスフェートなどを蚕用人工飼料に添加するものである。このうちアスコルビン酸-3-パルミテート、アスコルビン酸-3-ステアレート、アスコルビン酸-3, 6-ジステアレート及びアスコルビン酸-2-ホスフェートなどは熱や酸化に対し充分な安定性を持ち得ない物質であるが、蚕用飼料の製造条件ではアスコルビン酸類を含む栄養成分が一般に65°C以下の温和な温度で処理されるため、安定性についての問題は蚕用飼料ではないものの、耐水性を付与するため70°C以上で加工される最近の高温成型機による飼料の製造工程では、これらのアスコルビン酸類のほとんどが高温のため分解されてしまうという問題があった。また、L-アスコルビン酸-2-硫酸エステル、L-アスコルビン酸-2-ベンゾエート、アスコルビン酸-2, 6-ジパルミテートなどは熱や酸化に対しては安定であったが、一部の生物では体内酵素でアスコルビン酸に変換されにくく、十分なアスコルビン酸活性を発現できないという問題があった。

【0006】一方、動物のストレス反応は動物が生活しているいろいろの環境、例えば、温度、光、栄養、飼育密度などの環境要因の変化程度と密接に関係する。環境の変化が小さいときには動物は体内の代謝制御機構をあまり大きく変化させることなく代謝適応を行う。しかし、環境の変化が大きくなると短期間での順応が困難になり、生命の維持と継続を前提とした質的に異なる代謝制御を行う。一般的に、環境の変化程度が大きくなるに伴って動物体内に生じるストレス反応の程度も大きくなることが知られている。(Yousef, M. K., Stress Physiology in Livestock Vol. I & II CRC Press, 1985; Young B. A. et al, J. Animal Science, 67, 2426-2432, 1989; Yamada, M. and Tanaka, M., Proc. XIX World's Poultry Congress, 1992, pp. 43-47; Siegel, H. S., Br. Poult. Sci., 36, 3-22, 1995; Yamada et al, Proc. 10th European Poultry Nutrition Symposium 1995, pp. 373-374.)

【0007】例えば、温度環境が家畜・家禽等の恒温動物の生理・生産機能に及ぼす影響の一例が、文献(山田:動物生産と環境調節 新版 生物環境調節ハンドブック、pp 234-248, 1995)において報告されている。即ち、18°C-26°Cの温度域では、鶏は産卵機能も活発であり顕著なストレス反応は生じない。しかし、環境温度が26°C-32°C域になると呼吸機能や行動様式に変化が始め、ストレス反応の兆候が見られる。環境温度が32°C-36°C域に達すると温度ストレスの程度が大きくなり、呼吸がパンティング呼吸とな

り、飲水や節食行動が非常に異なってくるし、産卵機能も極端に低下し養鶏産業において重大な経済的損失を生じさせる。そして、環境温度が36°C以上になると呼吸様式のみならず生命の維持に必須の体温調節機能などの重要な生理機能に影響が出始め、いろいろの機能を質的に変化させ、生命の危機に対応する。

【0008】この状態では生命の維持が最重要課題であるので、鶏は通常の生体物質合成機能を抑制し、ストレスプロテインの合成を促進し生体防御につとめる。このように環境温度の変化にともなって生体のストレス反応も変化するが、ストレス反応の生理的な構成要因として重大な代謝機能に関係した生体成分の濃度変化及び物質変換を接觸する酵素の活性変化が含まれる。特に、生体のエネルギー代謝に密接に関係する酵素の活性や生体防御のためのストレスプロテインの出現はストレス反応の程度を推定するための生理指標となる。

【0009】また代謝機能の変化として、肝臓や腎臓などでの糖代謝、脂質代謝、アミノ酸代謝、糖質とアミノ酸との相互変換代謝など多くの代謝経路が関係するが、LDHとMDHは糖代謝、AspATは糖質とアミノ酸代謝に関係する重要な酵素である。それ故、近年LDH、MDH、AspATの活性の血中濃度の上昇は代謝機能の側面からの生体ストレス反応を表現していることが報告され、このストレス反応の抑制が付加価値の高い家畜を育成する上で極めて重要な問題となっていた。また、ストレスタンパク質にはいくつかの分子種が存在するが、ストレス反応の性質によって変動する分子種が異なってくる。産卵鶏の血漿に80-85 KDaのストレスタンパク質が出現することが認められることは他の動物の場合とは異なる (Lindquist, S., Ann. Rev. Biochem. 1986; Morimoto R. I. and MilarSKI, K. L., Stress protein s in biology and medicine, pp. 323-359, 1990; Siegel, H. S., Br. Poult. Sci., 36, 3-22, 1995)。しかし、生体防御反応におけるストレス蛋白質の生成を軽減あるいは生成が発生しないようにすることは、動物を健全で効率的に飼育する上で極めて重要な問題であり、そのストレス反応の制御及び軽減法の開発が望まれていた。

【0010】動物がストレスを受けたとき、血液中のLDH、MDH、AspATの上昇や変動等のストレス反応は観察されるが、体重の減少、卵殻強度の低下などの外部から目視で観察できるようなストレス現象は発生しない場合が多いし、発現した場合でもかなりの時間が経過した後に判明することが多い。しかし、上記のストレス反応が長期間続いたり、感染疾病等の別のストレスを多重に受けた場合、動物のストレスは次第に蓄積、増幅され家畜管理者の知れないまま重大な疾患、あるいは肉

質、卵質、乳質等の悪化を引き起こす可能性がある。しかしながら従来の技術ではこのような血中LDH、MDH、AspATの上昇変動等のストレス反応を十分に抑制できる方法の報告はなかった。従って、特に高度に集約的に効率化された昨今の畜産業や養鶏業においては、目視では観察できないストレス反応を察知し、これを抑制するための手段を講ずることが健全な家畜の飼養管理の点で重要な問題となっていたが、この検出を動物の血液中のLDH、MDH、AspAT等の測定を行うことによりこれを見逃すことなく検知できることがわかった。

【0011】以上のように、動物のストレス反応として血漿LDH、MDH、AspATの上昇及び血中ストレスプロテインの上昇反応は、極めて重要なストレスの生理的指標であり、従来のストレス抑制に関する発明では有用家畜のこれらのストレス反応を検出し、ストレスを抑制する動物用ストレス反応緩和剤及びそれを投与して動物のストレス反応を緩和する方法はなかった。また、過去に高温環境で飼育した採卵鶏において、ビタミンCを経口投与し鶏の卵殻強度を増強させる方法などは報告されているが、ストレスの重要な生理学的指標である血漿LDH、MDH、AspATの上昇抑制及び血中ストレスプロテインの上昇抑制させ生物が受けけるストレスそのものを総合的に防止する方法は見出されていなかった。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、動物のストレス反応として検出できる血漿LDH、MDH、AspAT及び血中ストレスプロテインを測定しこれらの上昇を抑え、動物の成育阻害や死亡率の低下させるための、動物用ストレス反応緩和剤の開発及び該ストレス反応緩和剤を用いてストレス反応を緩和する方法の開発を目的とする。

【0013】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、高温加熱成型機をもちいた飼料の製造工程でも分解されず安定で、牛、豚、犬、猫、ニジマス、鮎、鯉、鰐、鰻、ハマチ、フグ、ヒラメ、マグロ、アジなどの広範囲な有用経済動物に対してアスコルビン酸の抗ストレス活性を十分に発現でき、高率で吸収され上記のストレス反応に対し効果のある物質を模索検討した結果、L-アスコルビン酸誘導体としてL-アスコルビン酸-2-モノリン酸エステルやL-アスコルビン酸-2-グルコシド及びそれらの塩類を用いればストレス性血漿LDH、MDH、AspAT及び血中ストレスプロテインの上昇を有意に抑制できることを見いだし、更にこれらのストレス抑制

(緩和) 反応を強化できる処方を見出し本発明を完成させた。即ち本発明は、(1)動物のストレス時に増加する血液中の血漿Lactate dehydrogenase (乳酸デヒドロゲナーゼ) (LDH)、Mala

te dehydrogenase (リンゴ酸デヒドロゲナーゼ) (MDH)、Aspartate aminotransferase (アスパラギン酸アミノ基転移酵素) (AspAT) 及び血中ストレスプロテイン (ストレスタンパク質) の上昇を抑制するL-アスコルビン酸-2-リン酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシドから選択される一種以上を有効成分として含有する動物用ストレス反応緩和剤、(2) L-アスコルビン酸-2-リン酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシドから選択される一種以上に抗酸化物質を配合した(1)記載の動物用ストレス反応緩和剤、(3)抗酸化物質が、カロチン、アスタキサンチン、ルテイン、d1- α -トコフェロール酢酸エステル、 α -トコフェロール、SOD、グルタチオン及びカテキン類の少なくとも一種である(2)記載の動物用ストレス反応緩和剤、(4)(1)～(3)のいずれかに記載の動物用ストレス反応緩和剤を、プレミックス、動物用薬剤または栄養強化剤として飼料組成物に配合した動物用ストレス反応緩和剤組成物、

【0014】(5)動物のストレス時に増加する血液中の血漿Lactate dehydrogenase (乳酸デヒドロゲナーゼ) (LDH)、Malate dehydrogenase (リンゴ酸デヒドロゲナーゼ) (MDH)、Aspartate aminotransferase (アスパラギン酸アミノ基転移酵素) (AspAT) 及び血中ストレスプロテイン (ストレスタンパク質) の上昇を抑制するため、L-アスコルビン酸-2-リン酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシドから選択される一種以上の物質を、0.03g/kg体重以上を投与する動物のストレス反応を緩和する方法、(6)動物のストレス時に増加する血液中の血漿Lactate dehydrogenase (乳酸デヒドロゲナーゼ) (LDH)、Malate dehydrogenase (リンゴ酸デヒドロゲナーゼ) (MDH)、Aspartate aminotransferase (アスパラギン酸アミノ基転移酵素) (AspAT) 及び血中ストレスプロテイン (ストレスタンパク質) の上昇を抑制するため、有効成分としてL-アスコルビン酸-2-リン酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシド及びその塩類から選択される一種以上の物質を、0.03g/kg体重以上と他の抗酸化物質を0.02g/kg体重以上を同時に投与する動物のストレス反応を緩和する方法、(7)動物が、牛、豚、犬、猫、ニジマス、鮎、鯉、鯛、鮭、鰻、ハマチ、フグ、ヒラメ、マグロ、アジ、車エビである(5)または(6)のいずれかに記載の動物用ストレス反応を緩和する方法、(8)動物の飼料に対し、有効成分としてL-アスコルビン酸-2-リン酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシドから選択される一種以上を含有する動物用ストレス反応緩和

剤を有効成分300ppm以上を配合した飼料組成物、(9)動物の飼料に対し、有効成分としてL-アスコルビン酸-2-リン酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシドから選択される一種以上の物質を300ppm以上と、抗酸化物質を200ppm以上を含有する動物用ストレス反応緩和剤を配合した飼料組成物、(10)(8)または(9)のいずれかに記載の、有効成分としてL-アスコルビン酸-2-リン酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシドから選択される一種以上の物質を300ppm以上、またはこれと抗酸化物質を200ppm以上を含有する動物用ストレス反応緩和剤を配合した飼料組成物を、牛、豚、犬、猫、ニジマス、鮎、鯉、鯛、鮭、鰻、ハマチ、フグ、ヒラメ、マグロ、アジまたは車エビに給餌する動物のストレス反応を緩和する方法、(11)有効成分としてL-アスコルビン酸-2-リン酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシドから選択される一種以上の物質を300ppm以上、またはこれと抗酸化物質を200ppm以上を含有する動物用ストレス反応緩和剤を配合した飼料組成物が、エクストルーダー、エキスピандラー、ペレットマシンまたは乾燥機で80°C以上に加熱された飼料組成物である(8)または(9)のいずれかに記載の飼料組成物を開発することにより上記の課題を解決した。

【0015】

【発明の実施の形態】以下、本発明を更に詳細に説明する。本発明の有効成分であるL-アスコルビン酸-2-リン酸、L-アスコルビン酸-2-グルコシド及びそれらの塩類の「塩類」とは、その塩類がアルカリ金属、アルカリ土類金属などから選択される(好ましくはナトリウム塩、マグネシウム塩など)金属から選択された金属塩である。本件発明に用いられるL-アスコルビン酸-2-リン酸の塩としては、例えばL-アスコルビン酸-2-リン酸、その塩としては、例えばL-アスコルビン酸-2-モノリン酸マグネシウム、L-アスコルビン酸-2-モノリン酸ナトリウム、L-アスコルビン酸-2-モノリン酸カリウム、L-アスコルビン酸-2-モノリン酸カルシウム、L-アスコルビン酸-2-モノリン酸アルミニウム等、またL-アスコルビン酸-2-グルコシドの塩としては、2-O- α -D-グルコピラノシリル-L-アスコルビン酸(特開平5-117290号参照)などがあるが、好適にはL-アスコルビン酸-2-モノリン酸マグネシウム、L-アスコルビン酸-2-リン酸ナトリウム、2-O- α -D-グルコピラノシリル-L-アスコルビン酸が挙げられる。

【0016】本発明の有効成分であるL-アスコルビン酸-2-リン酸、その塩またはL-アスコルビン酸-2-グルコシドを有効成分とするストレス緩和剤に抗酸化剤を投与することによりストレス性血漿LDH、MDH、AspAT及び血中ストレスプロテインの上昇反応

を抑制する効果を更に高めることができる。本発明の効果を高めることができる抗酸化剤の例としては、d 1- α -トコフェロール、d 1- α -トコフェロール酢酸エステル、ビタミンE及びその誘導体；エリソルビン酸、茶抽出物、ポリフェノール類、エトキシキンなどの酸化防止剤；アスタキサンチンなどのカロチノイド類；クエン酸、グリシン等の有機酸類；リン酸、メタリン酸などのリン酸類；L-アスコルビン酸硫酸塩、L-アスコルビン酸パルミテート等のL-アスコルビン酸の安定化物（ただしL-アスコルビン酸-2-リン酸、その塩またはL-アスコルビン酸-2-グルコシドを除く）などから選択されるが、中でも抗酸化物質がカロチン、アスタキサンチン、ルテイン、d 1- α -トコフェロール酢酸エステル、 α -トコフェロール、SOD、グルタチオン、カテキン類から選択される一種以上の物質との併用が動物のストレス性血漿LDH、MDH、AspAT及び血液中のストレスプロテインの上昇抑制作用が強い。

【0017】本発明における飼料用組成物に配合する動物用ストレス反応緩和剤としては、有用動物の体内に栄養や有用な薬品類を投与または補強する目的で作られた全てのタイプの投与剤形をとることができ、代表的な例としては、飼料、プレミックス剤、ビタミン剤、動物用医薬品などの形式のものであってよい。

【0018】動物に対し、本発明の有効成分であるL-アスコルビン酸-2-モノリン酸、その塩及びL-アスコルビン酸-2-グルコシドから選択される一種以上の物質の1回の投与量は、動物の種類によらず動物の体重1kg当たり0.03g以上、好ましくは0.03~1.5g、特に好ましくは0.03~0.6gを投与する。また通常の飼料に添加して投与する場合は、L-アスコルビン酸-2-リン酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシドから選択される一種以上の物質を、飼料の全重量に対し300ppm以上を配合する。動物用ストレス反応緩和剤を抗酸化物質と併用する場合は、本発明の有効成分であるL-アスコルビン酸-2-モノリン酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシドから選択される一種以上の物質の1回の投与量は、動物の種類によらず動物の体重1kg当たり0.03g以上を、抗酸化物質から選択される一種以上の物質を動物の種類によらず動物の体重1kg当たり0.02

g以上、好ましくは0.02~1g、特に好ましくは0.02~0.1gとともに投与する。更に動物用ストレス反応緩和剤を抗酸化物質と併用し飼料に添加する場合は、本発明の有効成分であるL-アスコルビン酸-2-リン酸、その塩類及びL-アスコルビン酸-2-グルコシドから選択される一種以上の物質を飼料重量に対し300ppm以上と本発明の抗酸化物質から選択される一種以上の物質を動物の種類によらず200ppm以上を同時に投与飼料に配合する。

【0019】従来有用動物のストレスを減少させるため、動物用飼料にアスコルビン酸は添加されることもあったが、一般的のL-アスコルビン酸は耐熱性に乏しく酸化分解されやすいため、保存、取扱に困難をともない、特に飼料等への添加においては、配合された飼料の成形、乾燥などの工程において、殺菌、消毒及びたんぱく質の消化性を改善するためグルテン化を促進する高温加熱が不可能となり、このような高温加熱操作をする時は添加したL-アスコルビン酸もすみやかに失活し、その効果を持続させることが困難であるという問題があった。特に最近飼料の製造において、一般的に使用されているペレットミル、エクストルーダーなどの加熱型造粒機は原料温度を高温にするため、一般的のL-アスコルビン酸では速やかに分解されてストレス反応緩和剤の効能を失うことが避けられなかった。これに対し、本発明のストレス反応緩和剤に使用するL-アスコルビン酸誘導体は、100°C以上においても安定性があって、飼料の殺菌、消毒及びグルテン化を促進するための加熱高温成形が可能であり、ストレス反応緩和剤として優れているだけでなく、飼料の添加剤としても極めて優れたい。

【0020】

【実施例】以下実施例を挙げて、本発明をさらに具体的に説明するが本発明はこれにより制限されるものではない。

（動物用ストレス反応緩和剤）下表に示す組成の原料を配合し、ミキサーで充分に混合し、動物用ストレス反応緩和剤を作成した。それぞれの反応緩和剤組成物を試験区1から5とし、これを表1に示す。

【0021】

【表1】

試験区 No.	化学品名	配合組成
試験区1	L-アスコルビン酸-2-モノリン酸 エステルナトリウム	100%
試験区2	L-アスコルビン酸-2-モノリン酸 エステルマグネシウム	100%
試験区3	L-アスコルビン酸-2-グルコシド L-アスコルビン酸-2-モノリン酸 エステルマグネシウム	50% 50%
試験区4	L-アスコルビン酸-2-モノリン酸 エステルナトリウム d1- α -トコフェロール酢酸 エステル	50% 50%
試験区5	L-アスコルビン酸-2-モノリン酸 エステルカルシウム β -カロチン配合ニンジン抽出物 オキアミ抽出アスタキサンチン混合物 ルテイン配合マリーゴールド抽出物 ビタミンE配合小麦はい芽 SOD配合緑茶混合物 グルタチオン配合酵母 カテキン類配合緑茶抽出物	50% 10% 10% 10% 10% 3% 3% 4%

【0022】(ストレス緩和用飼料組成物) コーン75% (以下%は重量百分率)、大豆粉 (CP45%) 20%、リン酸カルシウム1.5%及び適量の無機物混合物、酵母、アスコルビン酸類を除いた総合ビタミン混合物が配合された飼料に、上記の5種類の動物用ストレス反応緩和剤をこの飼料に対し、600 ppmの割合になるようにそれぞれ配合し、十分に攪拌したものを通常のペレッターマシンで加熱 (最高温度 100°C) 成形し、これを乾燥し (最高温度 82°C)、本発明のストレス緩和用飼料組成物5種を作成した。

【0023】(比較用飼料組成物の作成) 上記とは別に、本発明の動物用ストレス反応緩和剤に代えて、市販の耐熱性の油脂コーティングL-アスコルビン酸類を表2の通り配合した物を、600 ppm含有させた飼料を

実施例2と同じ方法で作成した。即ちコーン75% (以下%は重量百分率)、大豆粉 (CP45%) 20%、リン酸カルシウム1.5%、L-アスコルビン酸ナトリウム0.5%及び適量の無機物混合物、酵母、アスコルビン酸類を除いた総合ビタミン混合物を添加し、よく攪拌したものを通常のペレッターマシンで加熱成形し、これを乾燥して対照区飼料とした。飼料の加熱成形処理、乾燥は飼料効率の改善、飼料中の雑菌の低減、畜舎ダストの低減のために行ったが、その条件はペレッター中の品温の最高温度約摂氏70度であり乾燥条件は50度で20分行いその後室温環境に放置した。

【0024】

【表2】

対象区 No.	化学品名	配合組成
対照区1	油脂コーティングL-アスコルビン酸ナトリウム	100%
対照区2	油脂コーティングL-アスコルビン酸マグネシウム	100%
対照区3	油脂コーティングL-アスコルビン酸 グルコース リン酸マグネシウム	50% 25% 25%
対照区4	油脂コーティングL-アスコルビン酸ナトリウム d1- α -トコフェロール酢酸エステル	50% 50%
対照区5	油脂コーティングL-アスコルビン酸カルシウム β -カロチン配合ニンジン抽出物 オキアミ抽出アスタキサンチン混合物 ルテイン配合マリーゴールド抽出物 ビタミンE配合小麦はい芽 SOD配合緑藻混合物 グルタチオン配合酵母 カテキン類配合緑茶抽出物	50% 10% 10% 10% 10% 3% 3% 4%

【0025】(実施例1)

(豚に対する効果) 豚に対する動物用ストレス反応緩和剤の血漿LDH、MDH、AspAT及び血中ストレスプロテインの上昇抑制効果を確認するために上記のストレス反応緩和用飼料組成物で作成した飼料組成物及び比較例1で作成した飼料組成物を使用し、以下の実験を行い本発明の効果を確認した。ランドレース×ヨークシャ種の30日齢雄豚100頭を、10頭ずつ10組に分け(体重をそろえた2組20頭を1試験区として5試験区を設定した。) 本発明の試験製剤5種の試験を行った。1試験区の1組10頭に対し、本試験区1の飼料を与え、他の1組10頭に対し対照区の飼料を与えて飼育した。同様に試験区2から5区、対照区2から5区を設定した。これらの豚は、乳期及び離乳期を除く23日齢まで同じビタミンC無添加の市販飼料で飼育した。

【0026】試験区には、一日に体重1kg当たり、L-アスコルビン酸-2-リン酸塩約0.02ミリモルを経口投与するように、前記の高濃度L-アスコルビン酸-2-リン酸エステル誘導体含有飼料を、毎朝一回、無添加一般飼料に配合し給飼した。体重測定は一週間に一度行い含有飼料の添加量の調整を行った。一方、対照区には、前記の対照区の処方の組成物が600ppmになるように配合し、給飼し飼育した。試験開始日にはストレッサーとして、豚を別の豚舎に移動させ、また同一時に体重をそろえるため編成変えを行った。この移動及び編成変え作業は豚にストレスとなり、増体重の減少など

の問題が過去の事例から確認されている。試験開始日から60日間それぞれ試験区、対照区の飼料で飼育し、61日後にそれぞれの豚から血液を採取し、血液中の血漿LDH、MDH、AspAT及び血中ストレスプロテイン、増体重を以下の方法で測定した。

【0027】(LDH、MDH、AspATの測定方法) 採取した血液を、温度4°C、2,000rpmでの遠心分離によって血漿を分離し、得られた上清画分を酵素測定用の標品とした。尚、酵素活性は30°CにおけるNADHの340nmでの吸光度の変化を分光学的に測定することによって決めた。酵素反応液の全量は3.0mlで、全体構成は次のとおりである。

(1) LDH及びMDHの場合: 200mMトリス緩衝液、1.0ml(最終濃度、6.7mM)、5mM NADH、0.1ml(0.17mM)、30mMKC1、0.1ml(1mM)、30mM 2-メルカプトエタノール(2-ME)、0.1ml、基質(LDHではビルビン酸; MDHではオキザロ酢酸)0.3ml(十分量、5-10mM)、水1.3ml及び血漿標品0.1mlを加えて全体を3.0mlとする。

(2) AspATの場合: 200mM トリス緩衝液1.0ml、5mM NADH、0.1ml、30mM KC1、0.1ml、30mM 2-ME、0.1ml、20mM α -ケトグルタレート0.3ml、補助酵素(MDH)0.1ml、50mMアスパラギン酸0.3ml、水0.9ml及び血漿標品0.1mlを加

えて全体を3.0mlとする。ここで酵素活性は初速度で決定した。

【0028】(ストレスプロテイン測定法) 血漿中のストレスタンパク質の分子量や分子種の数及び各分子種の存在量は主にSDS-PAGEを行ったゲルをタンパク染色した泳動図を用いて測定した。特に、各々のたんぱく質の存在量は、ゲルスキャナーを用い、その吸光度から相対比を求めた。SDS-PAGEの泳動条件をいろいろの動物から血漿標品の種類によって変えない範囲で電気泳動を行い、相互に比較検討した。

(増体重比) 対照区、試験区共に、試験開始時の体重を

(本発明のストレス緩和剤投与区のLDH、MDH、

AspATまたはストレスプロテインの平均値)

×100

(対照区のL-アスコルビン酸類投与のLDH、MDH、

AspATまたはストレスプロテインの平均値)

結果を表3に示すが、本発明の動物用ストレス反応緩和剤投与の血液中のLDH、MDH、AspAT、ストレスプロテインの平均値は、対照区のそれに比較しめざましく低下し、本発明の効果を確認できた。また、増体重の改善も見られた。本発明の抗酸化剤を含有したストレ

測定し、試験開始後60日後の増体重の値として以下の計算式で求めた値を比較した

増体重比 = (対照区の試験終了時の体重 - 対象区の試験開始時の体重) / (試験区の試験終了時の体重 - 試験区の試験開始時の体重) × 100

【0029】(結果) 以上のように本発明の5種のストレス緩和剤投与の血液中のLDH、MDH、AspAT、ストレスプロテイン、体重の増加率の平均値とそれに対応するそれぞれのコントロールの値を求め、以下の式で本発明のコントロールに対する比率を求め効果を比較した。

	試験区1	試験区2	試験区3	試験区4	試験区5
LDH比	53	50	63	40	47
MDH比	74	76	80	55	55
AspAT比	64	55	59	58	63
ストレスプロテイン比	77	76	80	64	61
増体重比	30	46	56	18	26

ス反応緩和剤投与したものは、それを含有しないものに比べ更に良好な効果を奏した。

【0030】

【表3】

【0031】(実施例2)

(牛に対する効果) 牛に対する本発明の効果を確認するために以下の実験を行いその効果を確認した。ホルスタインの53日齢雄牛を、(L-アスコルビン酸-2-リノ酸エステルカルシウム添加区) 25頭、(無添加区) 25頭、計50頭使用した。この牛は、乳期及び離乳期を除く53日齢まで、同じビタミンC類無添加の市販飼料で飼育された牛を使用した。

【0032】フスマ30% (以下%は重量百分率) 、大麦粉20%、米糖44%、大豆粕5%、食塩0.5%及び適量の無機物混合物、アスコルビン酸類を除いた総合ビタミン混合物の飼料に、表1に示した試験区4の処方の動物用ストレス反応緩和剤を上記飼料に対し600ppm添加し、十分に攪拌したものを通常のペレッターマシンで加熱成形し、これを乾燥して本発明のストレス緩和飼料組成物とした。これとは別に、試験区4の動物用ストレス反応緩和剤に代えて、表2に示した対象区4の処方の混合物を配合した飼料を上記と同じ組成で作成した。即ちフスマ30% (以下%は重量百分率) 、大麦粉

20%、米糖44%、大豆粕5%、食塩0.5%、L-アスコルビン酸カルシウム0.5%、無機リン酸ナトリウム0.25%及び適量の無機物混合物、アスコルビン酸類を除いた総合ビタミン混合物を添加し、表2に示した対象区4の処方の混合物を配合し、よく攪拌したものを通常のペレッターマシンで加熱成形しそれを乾燥して対照区飼料とした。飼料の加熱成形処理、乾燥は飼料効率の改善、飼料中の雑菌の低減のために行なったが、その条件はペレッターマシン中の品温の最高温度約摂氏75°Cであり乾燥条件は50°Cで20分行いその後室温環境に放置した。

【0033】試験区分は、試験開始時に試験区、及び対照区の牛をトラックで567km陸上輸送し、その後60日間にわたり、各飼料を自由給餌した。この飼養状態で60日間飼育し、61日後にそれぞれの牛から血液を採取し、血液中の血漿LDH、MDH、AspAT及び血中のストレスプロテイン、増体重を実施例1と同様の方法で測定した。測定結果は各区ごとに平均値を求める記と同様の計算式に従い、対照区との比率を算出した。

その結果を表4に示すが、本発明のストレス緩和剤投与区の血液中のLDH、MDH、AspAT、ストレスプロテインの平均値は、対照区のそれに比較しめざましく低下し本発明の効果を確認できた。また、増体重の改善も見られた。

【0034】

【表4】

	試験区と対照区の比
LDH比	0.3
MDH比	0.4
AspAT比	0.4
ストレスプロテイン比	0.7
増体重比	3.0

【0035】(実施例3)

(犬に対する効果試験) 平均体重8.7kgの純統ビーグル犬、雌6頭雄6頭、合計12頭を、雌雄3頭づつ試験区と対照区の2区に分け(1区雄3頭雌3頭)、試験区には前記試験区4の処方の成分が一般のビーグル犬飼料に600ppm添加されたストレス緩和用飼料組成物が与えられ自由給餌された。対照区には前記対照区4の処方の混合物が同じく一般のビーグル犬用飼料に600ppm添加され自由給餌された。試験は、1995年の8月1日から30日の夏場の高温期に野外に設置された解放畜舎による飼育で実施された。畜舎の温度管理は特にに行わなかった。この飼養状態で30日間飼育し31日後にそれぞれのビーグル犬から血液を採取し血液中の血漿LDH、MDH、AspAT及び血中ストレスプロテイン、増体重を前記と同様の方法で測定した。測定結果は各区ごとに平均値を求め前記と同様の計算式に従い対照区との比率を算出した。その結果を表5に示すが、夏場の高温ストレス下で飼育されたにもかかわらず、本発明の動物用ストレス反応緩和剤投与区の血液中のLDH、MDH、AspAT、ストレスプロテインの平均値は、対照区のそれに比較しめざましく低下し、本発明の効果を確認できた。また、増体重の改善も見られた。

【0036】

【表5】

	試験区と対照区の比
LDH比	0.3
MDH比	0.4
AspAT比	0.4
ストレスプロテイン比	0.7
増体重比	3.0

【0037】(実施例4)

(水産動物に対する効果) 魚粉60%、イカミール10%、グルテン12.5%、タラ肝油1.5%、ベータカロチン0.1%、リン酸二水素ナトリウム1%、リン酸水素ナトリウム1.5%、ビタミンCを除いたビタミンプレミックス1.4%、エトキシキン0.02%、前記試験区4の動物用ストレス反応緩和剤を600ppm及び残分にコーングルテンを添加して100%とし、この原料を粉碎後にミキサーで十分混合した後、ペレットミルによりニジマス、鮎、鯉、鯛、鰻、ハマチ、フグ、ヒラメ、マグロ、アジ、車エビ用の水産動物用飼料を作成した。

【0038】(比較例2) 前記対照区4の処方の混合物を、実施例4と同じく600ppmとした他は同じ組成の飼料に、同じ製造方法で製造した。これらの飼料を養殖されているニジマス、鮎、鯉、鯛、鰻、ハマチ、フグ、ヒラメ、マグロ、アジに投与し、100日間にわたって飼養試験を実施し、101日後にそれぞれの動物の20固体を無作為に抽出してその血液を採取し、血液中の血漿LDH、AspATを前述と同様の方法で測定し、試験区と対照区の比率を前記と同様に求めた。また、試験終了時に各水産動物の生残率を測定し水産動物に対する有効性を調べた。結果を表6に示す。

【0039】

【表6】

生産種	ニジマス	鮎	鯉	鯛	鮭	鰯	ハマチ	フグ	ヒラメ	マグロ	アジ
LDH比	65%	59%	84%	89%	76%	85%	45%	64%	76%	55%	68%
AspAT比	65%	59%	84%	89%	76%	85%	45%	64%	75%	55%	68%
飼養試験終了時の試験区の生残率 ¹⁾	95%	85%	99%	88%	90%	90%	89%	87%	98%	95%	89%
飼養試験終了時の対照区の生残率 ¹⁾	75%	65%	90%	75%	83%	82%	69%	80%	88%	84%	80%

試験終了時の生残個体数

$$1) \text{生残率} = \frac{\text{試験終了時の生残個体数}}{\text{試験開始時の生残個体数}} \times 100 \text{ (%)}$$

【0040】

【発明の効果】動物がストレスを受けたとき、血液中のLDH、MDH、AspATの上昇や変動等のストレス反応は観察されるが、これらは極めて重要なストレスの生理学的指標であり、これを解消するために動物用飼料に対してL-アスコルビン酸の添加が行われてきた。しかし一般のL-アスコルビン酸誘導体は耐熱性に乏しく飼料添加剤としては十分な効果を発揮できなかった。また耐熱性に富むL-アスコルビン酸誘導体も開発されてきたが、一部の生物では体内酵素ではL-アスコルビン酸に変換されにくく十分なL-アスコルビン酸活性を発

揮できなかった。これに対し、本発明のストレス反応緩和剤として使用されるL-アスコルビン酸-2-リン酸及びその塩類、L-アスコルビン酸-2-グルコシド及びその塩類は、いずれも耐熱性に富むだけでなく、体内酵素で分解され、L-アスコルビン酸となるためL-アスコルビン酸活性が高いものであり、ストレス緩和剤として有用であるだけでなく、飼料用添加剤としても極めて優れたものであり、これを用いることにより、動物に対するストレス反応が予防でき、ストレスに伴う体重減少、免疫力低下等の有用動物の飼育における各種弊害を防止できる。

フロントページの続き

(51) Int.C1.⁶ 識別記号
 A 61 K 31/355
 31/375 AEU
 31/52
 31/70 AER

F I
 A 61 K 31/355
 31/375 AEU
 31/52
 31/70 AER